Feel so Bio 19キットシリーズ

＃006　遺伝子組換え キット

取扱説明書

ver.2.1

目次

本キットの特徴

本キットは、大腸菌にルシフェラーゼ遺伝子を持つプラスミドDNAを形質転換することにより遺伝子組換え大腸菌を作出する実験キットです。

本キットではホタルの尾部の生体発光として有名なルシフェラーゼの遺伝子を大腸菌に組み換えることで、光る大腸菌を作出します。本キットは、クラゲの蛍光タンパク質GFPを使用した遺伝子組換えと異なり有害なUVランプを使用せずに結果を確認することができるため、より安全に遺伝子組換えについて学習することが可能です。

本キットを用いることで遺伝子組換え、セントラルドグマ、生物発光について学習することが可能です。

遺伝子組換え実験を始める前に

**遺伝子組換え実験を行う際は、以下の項目を守って
実験を行ってください。**

① 実験中は、実験室の窓及び扉は閉じておくこと。
② 実験室内での飲食、喫煙又は食品の保存はしないこと。
③ 組換え体を取扱い後又は実験室を出るときは、手を洗うこと。
④ 機械式ピペットの使用が望ましい。また、口を使うピペット操作は行わないこと。
⑤ 組換え体の保管又は運搬を行う場合は、他の微生物又は組換え体と混同しないように管理すること。
⑥ 実験終了後は煮沸又は消毒液の投入等の措置により、組換え体を滅菌すること。
⑦ 組換え体の付着した器具等は、消毒又は滅菌すること。
⑧ 実験室は整理し、清潔を保つこと。
⑨ その他実験指導者の定める事項を遵守すること。

（遺伝子組換え実験指針別表4より）

キット使用時に必要な試薬・機材等の一覧

キット内容（生徒20名分）

品名	容量	数量
・大腸菌グリセロールストック	(25μL)	1本
・プラスミドDNA	(120μL)	1本
・10倍濃縮ルシフェリン溶液	(150μL)	1本
・アンピシリン溶液	(500μL)	1本
・形質転換溶液	(1.2mL)	1本
・LB液体培地（100mL用）		1包
・LB寒天培地（500mL用）		1包
・滅菌シャーレ		20枚（1包）
・ループ		50本（5包）
・マイクロチューブ		50本
・オートクレーブバッグ		2袋
・取扱説明書　（本書）		1冊

本キット以外に必要な試薬・機材一覧

品名	数量
・37℃インキュベーター	1台
・恒温槽（42℃に保温できるもの）	1台
・オートクレーブ機 （あるいは圧力鍋および電子レンジ）	1台
・マイクロピペット　20μL用	5本（各班1本）
200μL用	5本（各班1本）
・マイクロピペット用チップ	6箱（各班1箱及び予備）
・アイスボックス	5個(各班1本)
・クラッシュアイス	適量
・ビーカー（1L、300mL）	1個ずつ
・メスシリンダー（500mL）	1個

※機材につきましては弊社で取り扱っております。ご入用の際にはお問合せ下さい。

内容物について

大腸菌グリセロールストック

大腸菌（*Escherichia coli* JM109株）を培養したLB培地にグリセロールを加え、冷凍保存したものです。JM109株は研究用として扱われる安全な菌株です。使用直前まで-20℃で保存してください。

プラスミドDNA

ルシフェラーゼ遺伝子およびβラクタマーゼ遺伝子（アンピシリン耐性）をもつプラスミドDNAです
-20℃にて保存し、ご使用直前に氷上にて融解させてください。

１０倍濃縮ルシフェリン溶液

発光反応の際にルシフェラーゼの基質となる物質です。保存は-20℃で、ご使用の際には必ず氷上にて融解してください。

アンピシリン溶液

ペニシリン系抗生物質の一種です。100mg/mLに調整してあります。LB寒天培地の作成時に加えてください。ご使用までは、-20℃にて保存してください。

形質転換溶液

LB液体培地に有機溶媒を加え、形質転換を起こりやすくする溶液です。-20℃で保存してください。

LB寒天培地および液体培地

大腸菌などを培養する一般的な培地です。寒天培地は1袋あたりで500ml、液体培地は1袋あたりで100mLが作成可能です。常温にて保存し、使用前に三角フラスコなどで蒸留水に溶解し、アルミホイルをかぶせてふたをした上でオートクレーブを121℃で20分間以上おこなってください。オートクレーブ後は4℃での保存をお勧めします。

滅菌シャーレ

滅菌済み小型シャーレです。このシャーレを用いてLB固体培地を作成してください。常温で保存してください。

ループ

大腸菌の植菌や操作、プラスミドDNAを形質転換溶液に加える際に使用する滅菌済みループです。常温で保存してください。

マイクロチューブ

形質転換の作業を行う際に主に使用する滅菌済みチューブです。常温にて保存してください。

オートクレーブバッグ

使用後のシャーレやスポイト、チューブをオートクレーブ滅菌する際に使用するバッグです。実験中に使用した器具やシャーレなどは、この袋に集め、実験後にオートクレーブ処理によって滅菌してください。常温にて保存してください。

分注について

班構成

本実験キットでは４人１班（実験は２人一組）を推奨しています。

機材一班分

形質転換溶液	...210μL	1日目
プラスミドDNA	...10μL	1日目
大腸菌プレート（後述）	...1枚	1日目
LB液体培地	...250μL×2本	1日目
LB寒天培地	...2枚	1日目
ルシフェリン	...280μL	2日目

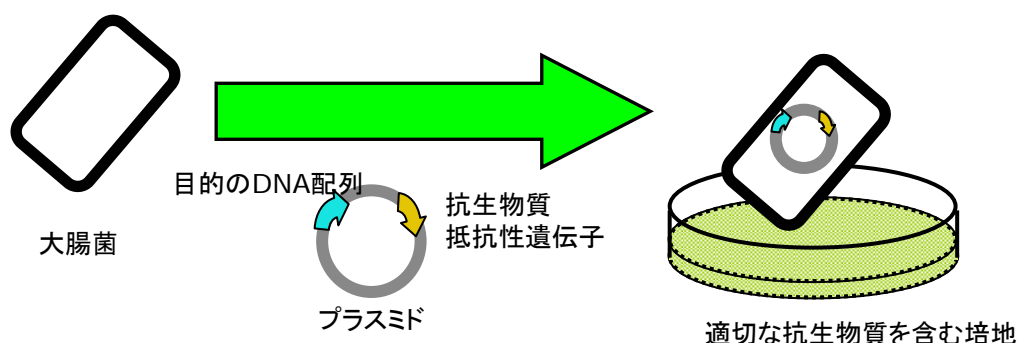
※内容物のご説明と取扱いの項、及び実験手順の項に従って試薬を溶解してください。

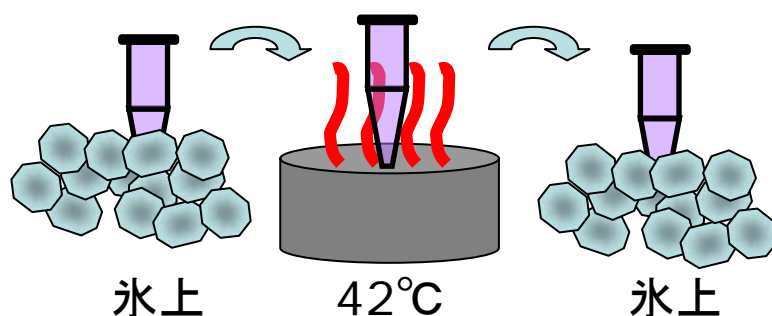
大腸菌の遺伝子組換え

遺伝子組換えとは

遺伝子組換え法は、植物細胞や動物細胞、細菌類などに外来の遺伝子を導入する方法です。遺伝子組換え法が開発され、初めて成功したのはたった30年ほど前ですが、いまでは基礎研究・農業・医療などさまざまな分野で応用され、将来は人々の暮らしを支える技術になると注目されています。ただし、生態系や人体への影響を懸念する声もあるため、現在もその影響を調べる研究が続けられています。

大腸菌の遺伝子組換え

大腸菌の遺伝子組換えを行う際には、プラスミドDNAとよばれる、環状のDNAがよく用いられます。プラスミドDNAは、細菌類などがゲノムDNA以外に持つ、いくつかの遺伝子がコードされた環状のDNAで、菌体内では複数コピー（数コピー～数百コピー）のプラスミドが保持されています。遺伝子組換えに使用されるプラスミドDNAには抗生物質抵抗性遺伝子がコードされており、抗生物質の存在下ではプラスミドDNAが保持され、プラスミドDNAを持つ大腸菌のみが選択されて生育します。この性質を利用し、プラスミドDNAに制限酵素処理（Feel so Bio19キットシリーズ＃004参照）などで目的のDNA配列を組換え、適切な抗生物質を含む培地で生育させると、遺伝子から発現したタンパク質を得たり、また大量に得たプラスミドDNAから未知のDNA配列を解読することができます。下図は大腸菌への遺伝子組換えの概略図です。

大腸菌へのプラスミドDNAの導入

大腸菌へプラスミドDNAを導入するためには、ヒートショック法とよばれる方法が用いられます。この方法では、まず塩化カルシウムなどで大腸菌を処理して膜の透過性を高めます（この状態の大腸菌をコンピテントセルと呼びます）。そこにプラスミドDNAを懸濁して氷上にしばらく置いた後、42℃・1分の熱ショックを与えることで、菌体内へプラスミドDNAを取り込ませます（下図）。このヒートショック法は大腸菌にプラスミドを取り込ませる際の方法として最もポピュラーなものですが、なぜ熱ショックを与えることで大腸菌がプラスミドDNAを取り込むことができるのか、そのメカニズムはあまり詳しく分かっていません。

本キットで使用するプラスミドDNA

本キットでは、抗生物質の一種アンピシリンに耐性の形質を示すβラクタマーゼ遺伝子と、ホタルの発光に関わるルシフェラーゼ遺伝子をコードしたプラスミドDNAを使用します。

βラクタマーゼについて

抗生物質は、カビなどが細菌類を駆除するために産生する化学物質で、1929年に初めて発見されました。抗生物質にはペニシリン系、テトラサイクリン系などさまざまな種類がありますが、今回使用するアンピシリンはペニシリン系の抗生物質です。アンピシリンはβラクタム環とよばれる構造を持ち、βラクタム環を活性中心として細菌の細胞壁合成を阻害することで、細菌の増殖を抑えます。βラクタマーゼは、このβラクタム環を分解するため、この遺伝子を持つ細菌はアンピシリン存在下でも生育が可能です。

ルシフェラーゼについて

ルシフェラーゼは、ホタルなどの発光生物がもつ酸化酵素の一種です。基質であるルシフェリンを、ATPと結合させて酸化する反応を触媒します。ルシフェリンはこの反応を経てオキシルシフェリンとなり、分子中の酸素が励起して励起一重項とよばれる状態になります。この状態から基底状態へ戻るときに、蛍光を発します。これがホタルの発光の原理です（＃008生物発光キット参照）。

本キットでは、ルシフェラーゼ遺伝子を持つプラスミドDNAを大腸菌へ導入し、ルシフェリンを加えることで、大腸菌がルシフェラーゼと自身のATPを用いて発光する現象を観察することができます。一方、プラスミドDNAを導入しなかった大腸菌では発光を観察することはできません。

実験手順

Part.1 実験前の準備

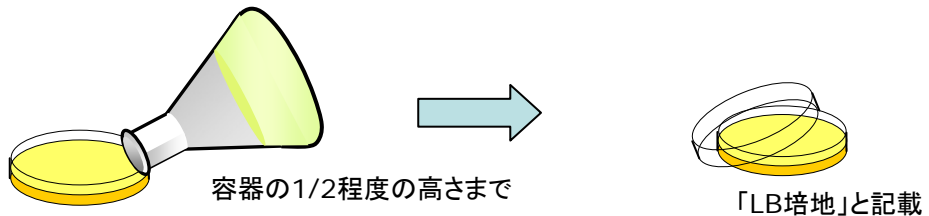
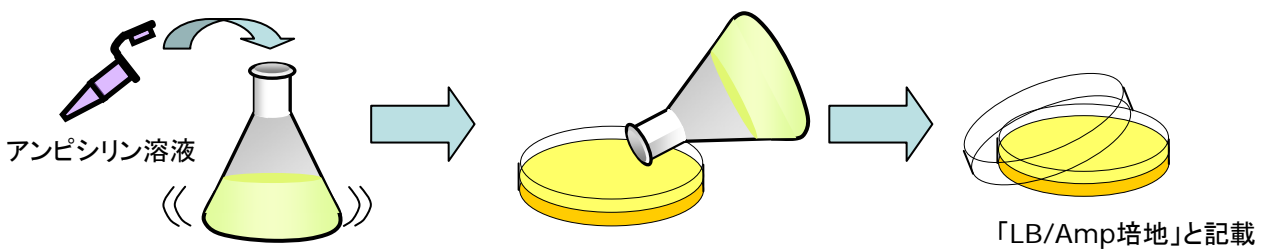
1）LB培地の作成 （授業の2～5日前）

LB寒天培地の作成

① LB寒天培地を開封し、1Lビーカーに全量を加えます。

② 蒸留水を500mL加えて良く撹拌し、培地を溶解します（中に含まれる寒天はこの段階では溶解しません）。

③ 121℃、20分以上のオートクレーブ処理をした後、60℃程度まで冷まします（＊1）。

④ クリーンベンチ内（＊2）でシャーレを開封し、まず6枚のLB寒天培地を作成します。③の培地を、シャーレの1/2の高さまで加え、半分蓋を開けた状態で置きます。蓋には「LB培地」と記載してください。

⑤ 残りの培地にアンピシリン溶液250μLを加え、よく振って撹拌した後に④と同じように14枚寒天培地を作成します。このシャーレの蓋には、「LB/Amp培地」と記載してください。

⑥ 培地が固まったら蓋を閉め、パラフィルムなどで蓋を固定します。LB培地は室温で清潔な場所で、LB/Amp培地は冷蔵庫にて保存してください。

＊1：電子レンジにて寒天の粒子がなくなるまで繰り返し沸騰させてもかまいません。ただし細菌類や真菌類の胞子は死滅しにくいため、コンタミネーションの可能性があります。

＊2：通常の実験台でも、実験台を70％エタノールでよく消毒し、ガスバーナーを焚いて落下菌を防ぐことでコンタミネーションを大幅に減らすことができます。

LB液体培地の作成

① LB液体培地を開封し、300mLビーカーに全量を加えます。

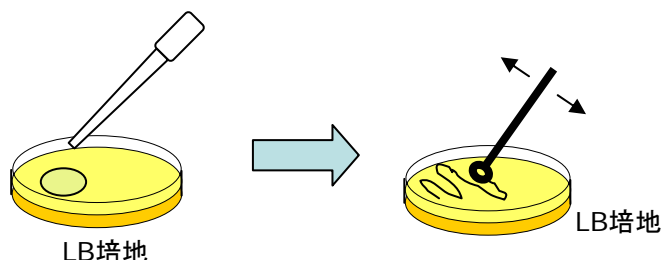
② 蒸留水を100mL加えてよく撹拌し、培地を完全に溶解します。

③ 121℃、20分でオートクレーブ処理をした後（＊3）、室温まで冷まして冷蔵庫にて保存します。当日までに、マイクロチューブに250μLずつ10本分注しておきます。

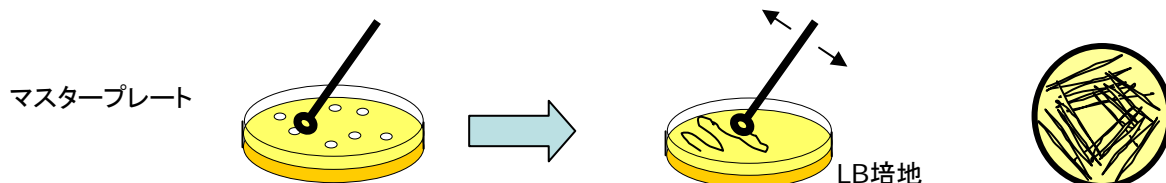
＊3: ＊1と同じく、電子レンジにて複数回沸騰させてもかまいません。ただし、同じ理由でコンタミネーションの可能性があります。

2）大腸菌マスタープレートの作成（授業の2日以上前）

① クリーンベンチ内で大腸菌グリセロールストックを開封し、全量をLB培地上にのせ、ループで伸ばします。

② 37℃の恒温槽に一晩①のプレートを入れ、大腸菌を増殖させます。

2）大腸菌プレートの作成（授業の1日前）

① クリーンベンチ内でマスタープレートを開封します。

② ループで大腸菌のコロニーをすくい取り、1）で作成したLB培地に植菌します。下図右のように、何度かLB培地を回転させながら大腸菌をすくったループを往復させます。強くループを押し付けるとLB培地が破損しますので、注意してください。

③ 37℃の恒温槽に一晩②のプレートを入れ、大腸菌を増殖させます。

Part.2 授業:実験当日(1日目)

実験直前の準備

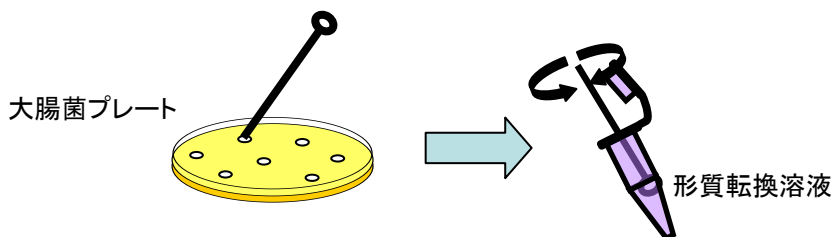
・アイスボックスを班数分用意し、氷を詰めておきます。

・プラスミドDNAをマイクロチューブに22μLずつ5本分注し、氷にさして冷やしておきます。

・形質転換溶液をマイクロチューブに210μLずつ5本分注し、氷にさして冷やしておきます。

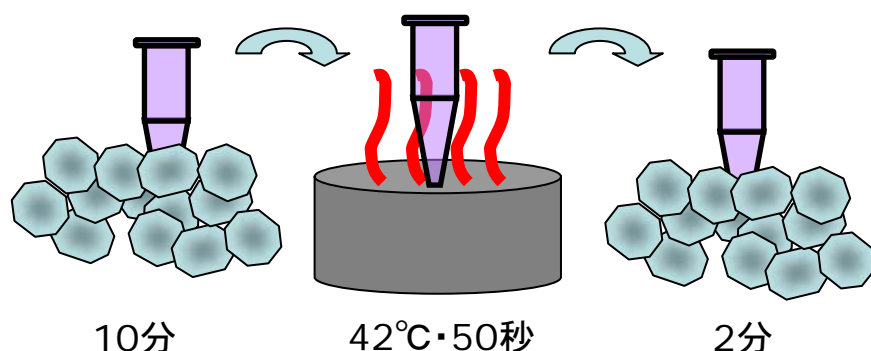
・LB液体培地をマイクロチューブに250μLずつ10本分注し、氷にさして冷やしておきます。

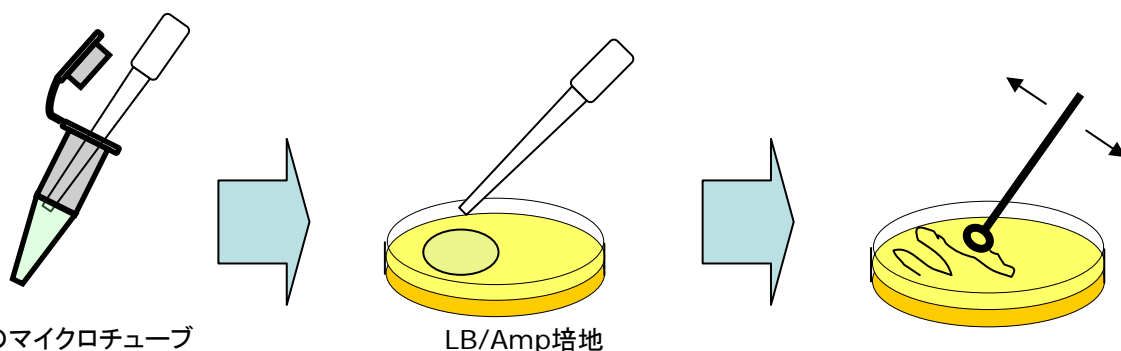
・各班に、大腸菌プレート×1、LB/Amp培地×2、プラスミドDNA22μL、形質転換溶液210μL、LB液体培地250μL、フローター×1、ループ1袋を配布します。

1)形質転換溶液を100μLずつ分注します。大腸菌プレートのコロニーをループの棒状の部分ですくい取り、形質転換溶液に塊が残らないようよく懸濁して氷上に戻します。

2)1)のマイクロチューブにプラスミドDNAを10μL加えます。

3)2)のマイクロチューブを氷上に戻し、10分静置します。

4)マイクロチューブをフローターに刺して42℃の恒温槽に浮かべ、50秒間ヒートショックを行います。

5）4)のマイクロチューブをすばやく氷上に戻し、2分静置します。

6）アイスボックスからマイクロチューブを取り出し、LB液体培地250μLを加えて10分間室温にて静置します。

7）6）の溶液100μLを培地上にのせ、新しいループを用いて薄く溶液を伸ばします。LB/Amp培地に植菌します。

この際、LB/Ampプレートだけでなく、LBプレートを用いて同様の作業を行うことで、アンピシリンの作用を確認することができます。但し作成できる培地の数が限られているため、全員の生徒にLB/Ampプレートを使用させる場合には必ずしも必要な作業ではありません。

8）培地の表面が完全に乾くまで待ちます。完全に乾いたらシャーレの蓋を閉め、パラフィルムなどで蓋を固定し37℃のインキュベーターにシャーレを入れます（＊4）。

＊4:このとき、シャーレは上下逆にし、蓋を下にして入れてください。蓋からの菌や水滴の落下によるコンタミネーションを防ぐことができます。

実験が終了したら、大腸菌プレートを冷蔵庫で保存しておきます。

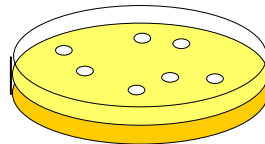
Part.3　授業:実験2日目

実験直前の準備

・アイスボックスを班数分用意し、氷を詰めておきます。

・10×ルシフェリン溶液を氷上で融解し、10倍希釈した後に140μLずつ10本に分注します。

・実験室に明かりが入らないよう、黒いカーテンなどで明かりを遮断します。

1）インキュベーターから前日作成したプレートを取り出し、コロニーを観察します。図のようなコロニーが形成されていれば、成功です。

2）照明を消し、コロニー上にルシフェリン溶液を全量滴下します。数秒蛍光を観察することができます。蛍光が消えたら、シャーレを傾ける、ループでコロニーを懸濁するなどすると、さらに蛍光が観察できます。前日使用した大腸菌プレートでは蛍光が観察されないことも確認してください。

実験後は、使用したスポイト・ループ・作成したプレートはすべてオートクレーブバッグに入れ、オートクレーブ機にて滅菌してください（＊5）。

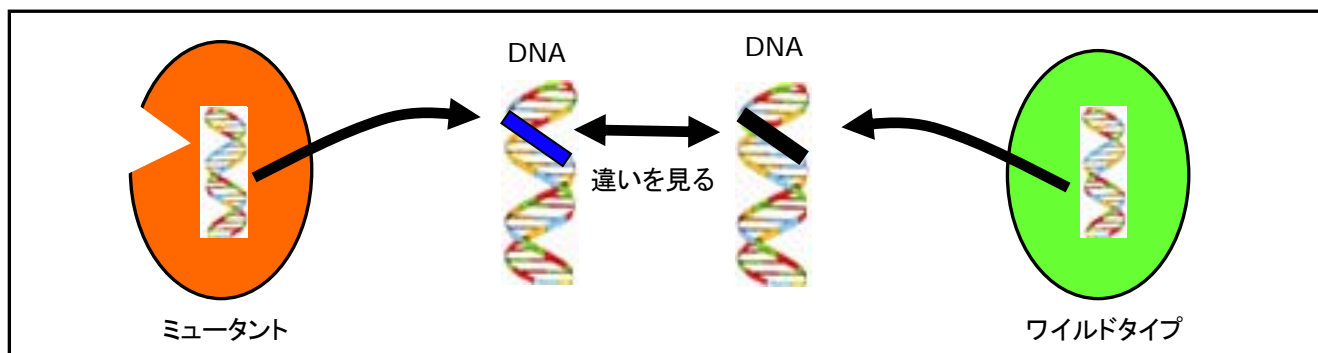
＊5:この作業は圧力鍋を用いても構いません。圧力鍋の圧力が十分に上がってから20分以上を目安に滅菌作業を行ってください。くれぐれも家庭や学校などで日常使用している圧力鍋は用いないでください。

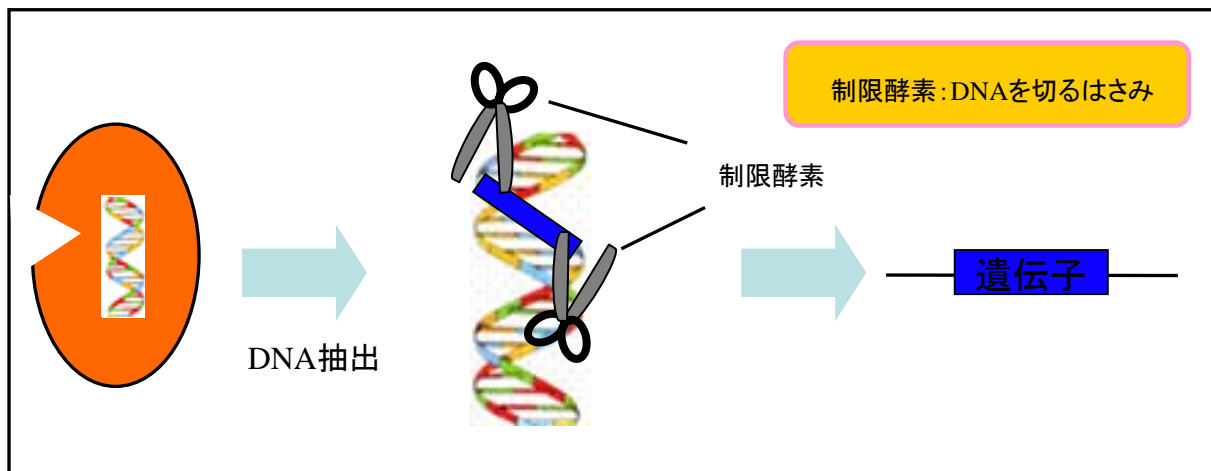
付録1　遺伝子組換え法の実際

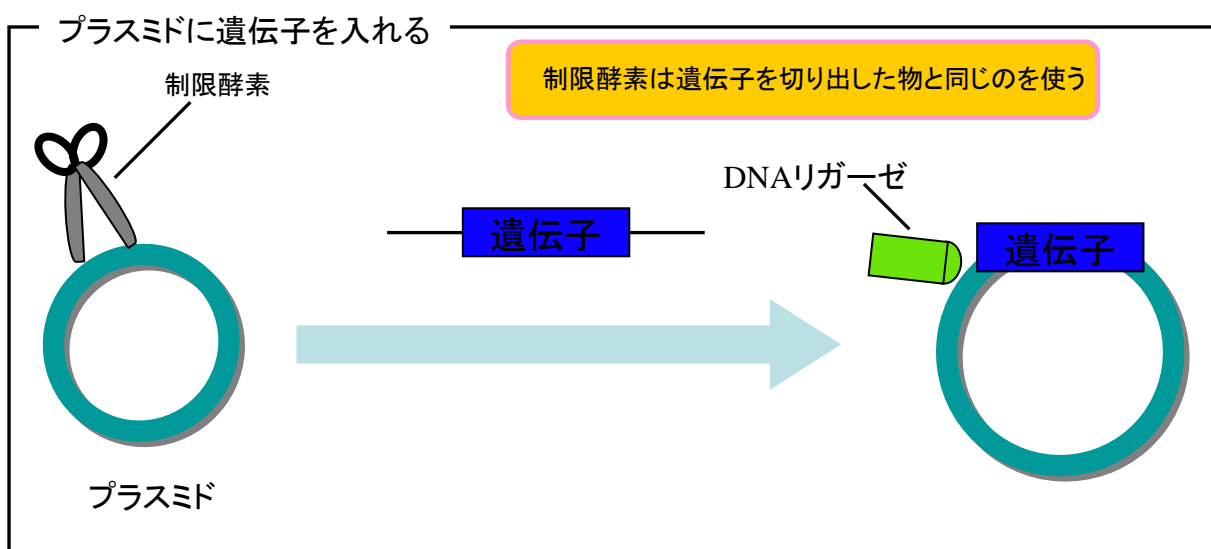
遺伝子組換え法の実際

　遺伝子組換え技術は主に、三つの主要な技術から成り立っています。この三つとは、「目的の遺伝子を見つける」、「目的の遺伝子を取り出す」、「目的の遺伝子を再び導入する」のことです。以下にこれらの技術について詳しく述べていきます。

（1）遺伝子を見つける

ミュータントを用いた解析によって、目的の遺伝子を見つけることができます。ミュータントというのは、変異体のことで、このDNAと正常な生き物（ワイルドタイプ）のDNAとを比較し、両者がちがうところをみつけだします。この方法には、DNAの配列を直接読むシークエンスという技術が用いられることもあります。これが、両者の違いを生みだしている原因になっている遺伝子です。このようにして見つけてきた遺伝子は遺伝子導入のために、PCRという手法（Feel so Bio19キットシリーズ＃003参照）を用いて大量に増幅されます。以下はその概略です。

（2）遺伝子をとりだす

（1）のようにして、見つけだされた目的の遺伝子をその生物から取り出します。それには、その生物からDNAを抽出し、そののち制限酵素といわれるDNAの特定の配列のみを切断する酵素によってDNAを切断し（Feel so Bio19キットシリーズ＃004参照）、目的の遺伝子を含んでいるDNA断片を得ます。次ページに、その概略を示します。

（３）遺伝子を導入する

（２）の方法によって取り出された目的の遺伝子はそのままでは、不安定で再び導入するのに適していないために、プラスミドDNAに組み込みます。そのとき、プラスミドDNAと遺伝子を含んだDNAはDNAリガーゼというDNA同士を連結する酵素によって結合されます（Feel so Bio19キットシリーズ#005参照）。このプラスミドを目的の生物に導入する方法は、目的の遺伝子、導入する生物種によって、本キットで用いるヒートショック法のほか、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、エレクトロポーテーション法などさまざまな方法があります。

付録2：
遺伝子組換え実験における注意点

遺伝子組換え実験は、カルタヘナ議定書の締結に伴い平成16年2月19日より施行されている、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（以下法律）によって安全確保が図られています。教育目的で行われる遺伝子組換え実験は法律においては第二種使用等に該当し、その実施については特別な規定は設けられていませんが、「遺伝子組換え実験指針別表7に定められた組合せである遺伝子組換え生物等又はこれと同等に安全管理の容易なものを用いる等安全上の観点から十分に配慮された実験として行うこと」が求められています。以下の項目を遵守した上で本キットをお使いいただけますよう、お願い申し上げます。

以下は遺伝子組換え実験指針の抜粋となります。

第8章　教育目的組換えDNA実験

教育目的組換えDNA実験については、別表7の宿主－ベクター系及び供与DNAの組合せを用いることとし（＊1）、この指針の他の規定にかかわらず、安全確保に関する次の措置をとることによって実施することができるものとする。

第1　実験の指導

この指針に示される実験の安全確保に関する考え方を理解しており、かつ、実験を実施した経験を有する者が実験指導者となるものとし、当該実験指導者が次の任務を果たすものとする。

1　実験の実施について、あらかじめ、実験指導者が所属する機関の長及び当該実験に使用する実験室が設置されている機関の長の同意を得ること。
2　実験従事者を適切に指導するとともに、実験全体の管理及び監督に当たること。
3　実験従事者の名簿、実験場所、実験日時、実験に用いる宿主－ベクター系及び供与DNA並びに組換え体の廃棄の方法を記載した記録を作成し、保存すること。
4　実験に用いる宿主－ベクター系及び供与DNAが別表7に掲げるものであることを実験実施前に確認すること。

また、遺伝子組換え実験指針では別表4により実験の方法が規定されていましたが、法律では第4条第1号及び第5条第1号の規定により、同省令別表第2第1号に掲げるP1レベルの拡散防止措置を執ることが義務付けられます。以下にその説明を述べます。

別表第二

一．P1レベル

イ　施設等について、実験室が、通常の生物の実験室としての構造及び設備を有すること。

ロ　遺伝子組換え実験の実施に当たり、次に掲げる事項を遵守すること。

（1）　遺伝子組換え生物等を含む廃棄物（廃液を含む。以下同じ。）については、廃棄の前に遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。
（2）　遺伝子組換え生物等が付着した設備、機器及び器具については、廃棄又は再使用（あらかじめ洗浄を行う場合にあっては、当該洗浄。以下「廃棄等」という。）の前に遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。
（3）　実験台については、実験を行った日における実験の終了後、及び遺伝子組換え生物等が付着したときは直ちに、遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。
（4）　実験室の扉については、閉じておくこと（実験室に出入りするときを除く）。
（5）　実験室の窓等については、昆虫等の侵入を防ぐため、閉じておく等の必要な措置を講ずること。
（6）　すべての操作において、エアロゾルの発生を最小限にとどめること。
（7）　実験室以外の場所で遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講じようとするときその他の実験の過程において遺伝子組換え生物等を実験室から持ち出すときは、遺伝子組換え生物等が漏出その他拡散しない構造の容器に入れること。
（8）　遺伝子組換え生物等を取り扱う者に当該遺伝子組換え生物等が付着し、又は感染することを防止するため、遺伝子組換え生物等の取扱い後における手洗い等必要な措置を講ずること。
（9）　実験の内容を知らない者が、みだりに実験室に立ち入らないための措置を講ずること。

＊1：本キットで用いられる宿主-ベクター系は、別表7によって定められたものに該当します。

ご使用上の注意

本製品は、バイオ教育を目的として開発されたキットです。本取扱説明書に記載されたプロトコル以外での使用につきましては、保証の限りではございません。

商品のご返品について

商品のご返品につきましては、弊社の確認を必要とさせていただきます。この確認なしでのご返品はご遠慮ください。適切な保存、ご使用をされていない製品についてはご返品をお受けできない場合がございます。また、品質保持のために返品された製品を再販することは一切ございません。

カスタマーサポート

Feel so Bioシリーズ　カスタマーサポート係

TEL：03-6277-8041

FAX：03-6277-8042

Mail：info@feelsobio.net

※FAXをご利用の場合は、同封のFAX用紙にご記入の上ご送信ください。

製造・販売元

株式会社リバネス　http://www.leaveanest.com

〒160-0004
東京都新宿区四谷2-8 藤井ビル5F
TEL 03-6277-8041
FAX 03-6277-8042

販売

コスモ・バイオ株式会社

〒135-0016　東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
TEL：（03）5632-9610　FAX：（03）5632-9619
e-mail：mail@cosmobio.co.jp
URL：http://www.cosmobio.co.jp/